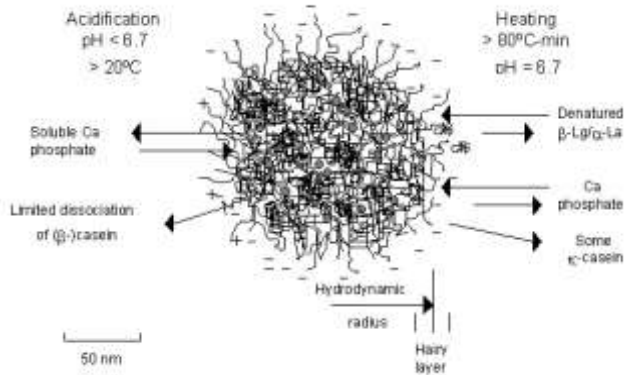
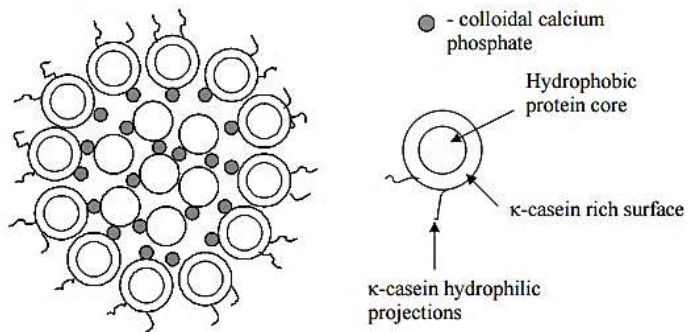


## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kasein



Gambar 2. Struktur misel kasein (Phadungath, 2005)



Gambar 3. Struktur submisel kasein (Phadungath, 2005)

Kasein merupakan komponen utama protein susu dengan jumlah sekitar 80% dari total protein susu (Fox *et al.*, 2000). Kasein terdiri dari  $\alpha$ s1-kasein,  $\alpha$ s2-kasein,  $\beta$ -kasein, dan  $\kappa$ -kasein.  $\alpha$ s2-kasein banyak mengandung gugus fosfoseril,  $\kappa$ -kasein punya satu gugus fosfoseril. Semua protein kasein mempunyai gugus hidrofobik dan hidrofilik di rantai proteinnya.  $\alpha$ -kasein mengandung 8-10 gugus fosfoserin,  $\beta$ -kasein mengandung 5 gugus fosfoserin, dan lebih hidrofobik daripada  $\alpha$ s-kasein dan  $\kappa$ -kasein.  $\kappa$ -kasein merupakan glikoprotein yang hanya memiliki satu gugus fosfoserin (Walstra *et al.*, 1999). Kasein banyak mengandung prolin, terutama kasein  $\alpha$ s1,  $\alpha$ s2 dan  $\beta$ , kasein mempunyai diameter partikel berkisar 50-500 nm (rata-rata 150 nm) dengan berat molekul  $10^6$ - $10^9$  Da (Livney, 2010).

Misel kasein merupakan koloid dengan diameter 50-500 nm (rata-rata 150 nm) yang terusun dari empat kasein utama yaitu  $\alpha$ s1-kasein,  $\alpha$ s2-kasein,  $\beta$ -kasein, dan  $\kappa$ -kasein (perbandingan molar 4:1:4:1). Kasein menyatu dalam misel melalui interaksi hidrofobik dan melalui jembatan nano-*cluster* kalsium-fosfat yang terikat ke gugus serin-fosfat dari kasein (Fox, 2003). Karakteristik kasein dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik kasein :

Karakteristik	Nilai
Diameter (nm)	50-500
Area permukaan (cm <sup>2</sup> )	$8 \times 10^{-16}$
Volume (cm <sup>3</sup> )	$2,1 \times 10^{-15}$
Densitas (g/cm <sup>3</sup> )	1,0632 g
Massa (g)	$2,2 \times 10^{-15}$
Kadar air (%)	63
Hidrasi (/g protein)	3,7 g H <sub>2</sub> O
Voluminositas (g)	4,4 cm <sup>3</sup>
Berat molekul (terhidrasi) (Da)	$1,3 \times 10^9$
Berat molekul (didehidrasi) (Da)	$5 \times 10^8$
Jumlah rantai peptide	$1 \times 10^4$
Jumlah partikel/mL susu (cm <sup>3</sup> )	$2 \times 10^4$
Jumlah misel/mL susu (nm)	240

Sumber : (Fox and McSweeney, 1998).

Karakteristik kasein mempunyai kelarutan yang rendah pada pH titik isoelektrik pada pH 4,5-4,8. Struktur kimia kasein merupakan mudah larut di air jika ditambah bahan alkali. Protein dalam kasein menyatu membentuk suatu koloid, suatu biokoloid yaitu misel kasein yang mempunyai diameter 9-150 nm, dan submisel dengan ukuran 10-20 nm (Moldoveanu and David, 2013). Partikel misel kasein merupakan koloid yang sangat terhidrasi, tersusun atas campuran fosfoprotein yaitu kasein dan kalsium-fosfat organik (Dalgleish, 2011). Tiga jenis kasein mempunyai ukuran dan berat molekul yang mirip

dan bermuatan negatif. Struktur kasein dipengaruhi oleh kombinasi muatan yang tinggi dan hidrofobisitas internal yang rendah (Uversky, 2002).  $\alpha$ -kasein memiliki dua triptofan (Trp), sementara  $\beta$ -kasein dan  $\kappa$ -kasein hanya memiliki satu triptofan (Trp). Kasein mengandung jumlah prolin dalam jumlah yang besar, khususnya di  $\beta$ -kasein yang sangat mempengaruhi struktur kasein, karena residu prolin merusak pembentukan  $\alpha$ -*helical* dan  $\beta$ -*sheet* (Swaigood, 1992). Perbedaan struktur kasein menunjukkan perbedaan afinitas  $\alpha$ -,  $\beta$ -, dan  $\kappa$ -kasein terhadap interaksi hidrofil dan hidrofob (Phadungath, 2005).

Stabilitas misel kasein dapat dibagi menjadi dua kategori, yaitu stabilitas intermisellar dan intramisellar. Stabilitas intermisellar, berfungsi membantu stabilitas kasein terhadap agregasi, seperti contoh dibawah pengaruh panas, alkohol, asam, atau renet. Stabilitas ini menjadi dasar dari konversi susu menjadi produk susu, sebagai contoh koagulasi susu oleh renet atau asam menjadi dasar pembuatan keju dan yoghurt. Stabilitas intramisellar yaitu kemampuan misel kasein untuk mempertahankan integritas struktural internal dibawah pengaruh perubahan lingkungan, menjadi pertimbangan terhadap sifat produk susu (Smiddy, Martin, Kelly, Kruif, and Huppertz, 2006).

## **2.2 Kulit Kakao**

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditi ekspor Negara Indonesia dengan nilai jual yang cukup tinggi. Kementerian Pertanian melaporkan bahwa pada tahun 2010 Indonesia menempati urutan ketiga sebagai negara penghasil kakao terbesar di dunia dengan total ekspor sebesar 900 ribu ton (Mulyatni, Budiani dan Taniwiryono, 2012). Pada

saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak.

Klasifikasi ilmiah kakao menurut (Karmawati, Mahmud, Syakir, Munarso, Ardana dan Rubiyo, 2010) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angioospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Dialypetalae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: Theobroma
Spesies	: Theobroma cacao L

Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah pertanian. Limbah kulit buah kakao yang dihasilkan dalam jumlah banyak akan menjadi masalah jika tidak ditangani dengan baik karena produksi limbah padat ini mencapai lebih dari 60% dari total produksi buah (Harsini dan Susilowati, 2007). Kulit buah kakao yang begitu banyak bila tidak ditangani dengan baik akan menjadi masalah yang cukup serius bagi lingkungan (Murni, R., Akmal dan Y. Okrisandi, 2012). Beberapa teknologi telah dikembangkan untuk mengolah kulit buah kakao menjadi pakan ternak, kompos, dan produk lain, tetapi masih diperlukan teknologi lain untuk dapat memanfaatkannya lebih optimal (Alemawor, Victoria, Dzogbefia, Oddoye *and* Oldham, 2009).

Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerisasi, seperti

antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin yang banyak terikat dengan glukosa (Matsumoto, Tsuji, Okuda, Sasaki, Nakano, Osawa, Shimura *and* Ooshima, 2004). Menurut Faramayuda, Alatas, dan Rayani (2013) polifenol golongan flavonoid terutama katekin yang terdapat pada kulit kakao dapat bermanfaat sebagai antioksidan. Antioksidan sangat dibutuhkan untuk melawan radikal bebas dalam tubuh manusia yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, kanker, dan penuaan.

### **2.3 Katekin Kulit Kakao**

Katekin adalah senyawa fungsional golongan polifenol yang merupakan antioksidan berfungsi melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan ini bekerja menekan kerusakan sel akibat proses oksidasi dari radikal bebas (Putri, 2010). Senyawa fenolik kakao dibagi menjadi beberapa kelas yaitu katekin, epikatekin, antosianin, pro-antosianidin, asam fenolik, tanin terkondensasi, flavonoid lain dan beberapa senyawa minor. Epikatekin menjadi komponen utama fenolik kakao, hampir 35% dari kadar polifenol biji kakao. Total fenolik terlarut dari biji kakao kering berkisar antara 2-6% (Shahidi *and* Naczki, 2003). Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerasi, seperti antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin yang banyak terikat dengan glukosa (Mulyatni, Budiani, dan Taniwiryono, 2012).

Senyawa tanaman polifenol menunjukkan interaksi yang kuat dengan protein globular dan bisa menyebabkan struktur protein terbentang. Dalam larutan, polifenol seperti katekin dapat membentuk kompleks larut dengan protein.

Afinitas pengikatan polifenol ke protein tergantung pada ukuran polifenol dan meningkat seiring dengan ukuran molekul (Kanakis *et al.*, 2011). Senyawa fenolik mampu berikatan dengan protein terutama dengan protein kaya prolin, seperti  $\beta$ -kasein (Zhou *et al.*, 2015).

## **2.4 Interaksi Kasein-Katekin**

Kasein digambarkan sebagai protein yang tidak berstruktur dengan kandungan prolin yang relatif tinggi dan berkemampuan untuk berinteraksi dengan dirinya sendiri ataupun dengan kasein lain pada misel. Residu prolin dan pengulangan prolin diketahui sebagai penentu interaksi protein-fenolik, oleh sebab itu berdasarkan kandungan prolannya  $\beta$ -kasein mampu menunjukkan afinitas yang lebih tinggi untuk fenolat dari pada  $\alpha$ -kasein (Bohin *et al.*, 2014). Polifenol mengikat lemah  $\alpha$ -kasein dan  $\beta$ -kasein melalui interaksi hidrofilik dan hidrofobik.  $\beta$ -kasein membentuk kompleks yang lebih kuat dengan polifenol daripada  $\alpha$ -kasein karena sifat  $\beta$ -kasein lebih hidrofobik (Hasni *et al.*, 2011).

Molekul tertentu seperti protein susu diketahui sebagai pelindung senyawa fenolik, utamanya katekin (Carnovale, Britten, Couillard, and Bazinet, 2015). Polifenol secara umum berinteraksi dengan globular protein dan dapat menyebabkan perubahan struktur dan konformasi protein. Afinitas pengikatan tergantung pada ukuran molekul polifenol, semakin tinggi molekul polifenol semakin besar kecenderungannya untuk membentuk senyawa kompleks dengan protein (Gallo, Vinci, Graziani, Simone, and Ferranti, 2013). Pengikatan ini bisa mempengaruhi kapasitas transfer elektron katekin dengan

mengurangi jumlah gugus hidroksil yang tersedia didalam larutan (Hasni *et al.*, 2011).

Senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan protein terutama yang kaya akan prolin seperti kasein. Interaksi kasein dengan senyawa fenol dipengaruhi banyak faktor, salah satunya adalah kadar prolin di kasein (Bohin *et al.*, 2014). Apabila dilihat dari kadar prolinnya,  $\beta$ -kasein mempunyai afinitas ke senyawa fenol lebih tinggi dibandingkan dengan  $\alpha$ -kasein (Hasni *et al.*, 2011). Gugus prolin mempunyai afinitas yang kuat ke gugus OH katekin (Arts, Haenen, Wilms, Beetstra, Heijnen and Voss, 2002). Prolin memiliki afinitas yang kuat untuk hidroksil (-OH) pada kelompok katekin. Penambahan polifenol dapat meningkatkan stabilitas panas dari susu dan meningkatkan waktu koagulasi (Yuksel, Avci and Erdem, 2010). Interaksi antara protein susu dengan polifenol (katekin) interaksi hidrofobik yang bersifat non-kovalen dan distabilkan oleh ikatan hidrogen. Pengikatan non kovalen termasuk hidrofobik, *van der waals*, pengikatan jembatan hidrogen, dan interaksi ionik ini lebih lemah dari ikatan kovalen dan selalu reversibel (Jakobek, 2015).

Interaksi antara flavonoid dengan protein susu bisa menjadi aditif makanan yang bisa diterima karena aktivitas antioksidan dan antikarsinogenik, jadi keduanya dapat berkontribusi terhadap fungsional produk. Interaksi flavonoid dengan protein susu menampilkan subyek yang penting karena interaksi tersebut bisa menjadi bahan tambahan makanan yang potensial (Yuksel *et al.*, 2010).

## **2.5 Daya Larut**



Kasein merupakan campuran  $\alpha$ -S1,  $\alpha$ -S2-,  $\beta$  dan  $\kappa$ -kasein, yang merupakan fraksi penting dan sumber bahan yang berharga karena untuk nutrisi spesifik dan fungsional. Faktor utama daya larut fraksi kasein di dalam air adalah pH, suhu, konstanta dielektrik, kekuatan ionik dan ionik lingkungan (kandungan kalsium dan fosfat) (Mezdour, Bruleb *and* Jozef, 2006).

Kelarutan protein akan menurun dengan adanya pemanasan, akan tetapi pada suhu 40-50° C kelarutan akan meningkat. Selain itu kondisi proses seperti pengadukan juga akan mempengaruhi kelarutan protein. Kelarutan protein merupakan sifat fungsional yang terbentuk akibat interaksi antara air dan protein. Interaksi senyawa fenolik dengan protein dapat menyebabkan perubahan sifat fisiko-kimia protein seperti kelarutan (Ozdal, Capanoglu *and* Altay, 2013). Menurut Anema, Lowe *and* Lee (2004) semakin banyak protein terdenaturasi akan meningkatkan jumlah ikatan disulfida bebas dan berpotensi untuk membentuk interaksi antar protein, menyebabkan berat molekul bertambah dan menyebabkan partikel turun ke dasar sebagai protein yang rusak.

## **2.6 Sedimentasi**

Secara umum struktur dan sifat misel kasein cukup tahan terhadap pemanasan sedang, namun pada suhu tinggi 140° C mengakibatkan disosiasi dan agregasi dan bahkan koagulasi misel kasein. Pemanasan pada suhu lebih dari 75° C berpengaruh terhadap misel kasein. Residu atau sedimen biasanya tidak larut dalam air, yakni mengandung: a. protein yang rusak atau mengalami denaturasi b. partikel yang hancur

atau lengket c. partikel yang sukar larut d. bahan campuran (Widodo, Rachmawati, Chulaila dan Budisatria, 2012).

Disagregasi atau pemisahan misel kasein melibatkan setidaknya tiga tahapan yaitu; (1) pemutusan hubungan dari kompleks koloid *intercaseinate* kalsium asam fosfat, (2) pemutusan dengan pemindahan kalsium kompleks *intercaseinate* (pembentukan unit kompleksitas kasein larut), dan (3) gangguan ikatan hidrogen atau hidrofobik, serta hubungan garam dalam *caseinate* yang dapat larut (pembentukan monomer) (Yamauchi and Chen, 1969).

## 2.7 Turbiditas

Misel kasein fosfat dan interaksi hidrofobik menjadi faktor utama mempertahankan misel kasein (Kruif and Holt, 2003). Perlakuan susu pada tekanan hidrostatik tinggi dapat mengakibatkan kerusakan misel kasein kemungkinan melalui pelarutan misel kalsium fosfat (Huppertz *et al.*, 2004). Perusakan misel kasein juga dapat dicapai melalui perusakan interaksi hidrofobik, sebagai contoh melalui penambahan urea (Kruif and Holt, 2003).

Agregasi atau disosiasi misellar menjadi partikel submisellar dapat dicapai dengan perubahan faktor lingkungan (seperti pH, suhu, dan kuat ionik) yang mempengaruhi stabilitas misel berkaitan dengan adanya konformasi tersier tiga dimensi yang kuat dalam misel kasein (Marchin *et al.*, 2007). Sebagai akibat dari disosiasi misel kasein dibawah pengaruh kondisi lingkungan tersebut, rata-rata ukuran partikel banyak berkurang, seringkali ukuran partikelnya tidak terdeteksi oleh teknik analisis ukuran partikel sederhana. Penurunan ukuran

partikel komponen koloidnya, berakibat pada penurunan turbiditas (Smiddy *et al*, 2006).

## **2.8 Mikrostruktur**

Kasein dalam susu sebanyak 80-95% berupa partikel terdispersi dalam bentuk koloid, yang disebut sebagai misel, mengandung bahan kering berupa protein 94% dan kalsium fosfat koloidal 6%, yang tersusun dari magnesium, fosfat dan sitrat. Ukuran misel kasein berkisar 50-500 nm (rata-rata 120 nm) dan berat molekul sekitar 106-109 Da (Fox *and* McSweeney, 1998).

Interaksi katekin dengan susu terbukti bergantung pada protein susu dan bukan fraksi lemaknya. Kasein merupakan protein paling melimpah dalam susu, membentuk kompleks koloid yang berfungsi sebagai pembawa untuk pengiriman protein, kalsium, potasium. Protein tersebut ditemukan dalam tiga bentuk yang berbeda:  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\kappa$ . Kasein  $\alpha$  dan  $\beta$  memiliki berat molekul serupa (24 kDa) dan mengandung kadar tinggi dari residu prolin. Protein semacam itu dilaporkan lebih besar mengikat afinitas dengan polifenol. Afinitas pengikatan polifenol meningkat dengan berat molekul dan jumlah gugus hidroksil hidrofilik. Protein ini mengikat dapat mempengaruhi kapasitas donasi elektron katekin dengan mengurangi jumlah gugus hidroksil yang tersedia untuk oksidasi dalam media. Interaksi polifenol-kasein yang kuat, yang menginduksi protein utama. Perubahan struktural sekunder dengan adanya polifenol. Perubahan diamati pada kedua konformasi protein dan polifenol. Struktur menunjukkan kompleksitas kasein-polifenol terhadap perubahan struktur protein dan aktivitas antioksidan polifenol dalam larutan encer (Bourassa, Cote, Hutchandani,

Samson, *and* Riahi, 2013). Misel kasein disusun dari submisel yang dihubungkan oleh jembatan kalsium fosfat dan interaksi hidrofobik, terdapat lapisan berambut yaitu  $\kappa$ -kasein pada permukaan misel memberikan interaksi sterik yang mencegah agregasi kasein (Zhong, Daubert, *and* Velez, 2007).